

METHODE OFFICIELLE D'ANALYSE

TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Réf. : MOA 010 version 1a



Dates de validité du présent document

Le présent document a valeur de méthode officielle à compter de sa date de publication indiquée ci-après. Il remplace alors *de facto* toute version antérieure.

Cependant, et sauf indication contraire explicite, la version précédente peut encore être utilisée pendant une durée maximale de 15 mois à compter de la date de publication de la nouvelle version, afin de tenir compte des cycles d'accréditation auxquels sont soumis les laboratoires de référence, agréés et reconnus officiellement.

Ce document étant susceptible d'évolution, il est de la responsabilité exclusive des utilisateurs de vérifier régulièrement qu'ils disposent bien de la dernière version.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la méthode.

MOA 010	**Consultation publique**		**Validité**	
Numéro de la version	**Début**	**Fin**	**Début**	**Fin**
version 1a	Juillet 2010	Septembre 2010	Octobre 2010	

SOMMAIRE

PREAMBULE

Objet des méthodes officielles

Les méthodes officielles, au sens du décret 2006-7 du 4 Janvier 2006, sont les méthodes validées par le ministère chargé de l'agriculture pour l'utilisation dans le cadre des actes officiels relevant de ses services (plans de contrôle et de surveillance, contrôles à l'importation et à l'exportation…). Ces méthodes concernent le diagnostic, la détection ou l'identification d'organismes nuisibles aux cultures, d'organismes envahissants ou d'organismes génétiquement modifiés pour le domaine d'application précisé dans la méthode.
Ces méthodes servent de « méthodes publiées » au sens de la norme ISO 17025 pour l'accréditation des laboratoires par le COFRAC.

Glossaire, abréviations et documents connexes

Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans les méthodes officielles du ministère chargé de l'agriculture est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP…).
Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps des méthodes officielles.
Certains documents (composition de milieux et tampons…) peuvent être communs à plusieurs méthodes officielles. Pour faciliter leur harmonisation et leur mise à jour, ils sont rassemblés dans des recueils spécifiques, considérés comme faisant partie intégrante des méthodes officielles. Les méthodes officielles appellent alors ces documents spécifiques en donnant leur code tel que repris dans les recueils.

Limites imposées aux laboratoires agréés ou reconnus

Le ministère chargé de l'agriculture peut proposer ou imposer aux laboratoires, agréés ou reconnus, de stopper l'analyse à une certaine étape précisée dans la méthode officielle et, le cas échéant, de transmettre le matériel nécessaire à la poursuite de l'analyse dans un autre laboratoire, agréé ou de référence. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de veiller à suivre les contraintes définies par son périmètre d'agrément ou de reconnaissance et par les exigences du ministère.

Échantillonnage et échantillon

L'échantillonnage est de la responsabilité des préleveurs et ses modalités sont définies par ailleurs.
L'échantillon reçu est réputé être homogène en l'état de sa réception. Par contre, il n'est pas forcément représentatif du lot d'où il provient et le laboratoire ne pourra en aucune façon attester du caractère représentatif au sens de la statistique.
Le laboratoire peut être amené à séparer l'échantillon reçu en sous-échantillons pour les besoins de l'analyse, il s'agit alors d'une simple division et non d'un réel sous-échantillonnage au sens de la statistique, et le laboratoire n'a pas de ce fait à être accrédité pour l'échantillonnage.

Modification des méthodes officielles

Sur le principe, seules les méthodes officielles peuvent être utilisées dans le cas d'analyses officielles, sans aucune modification. Néanmoins, et afin que les laboratoires puissent mieux utiliser leurs ressources et valoriser leur expérience, la possibilité leur est laissée d'utiliser des méthodes dérivées ou alternatives, ou de remplacer un réactif-clé à la condition expresse que le LNR ait validé la modification.

Une méthode dérivée résulte de modifications de portées limitées appliquées à la méthode officielle (par exemple, remplacement d'une procédure d'extraction de l'ADN par une autre, utilisation d'un appareil de préparation de l'échantillon différent de celui prévu dans la méthode officielle…).
Une méthode alternative s'appuie sur des principes ou des technologies différentes de celles décrites dans les méthodes officielles, il s'agit réellement d'une autre méthode.
Un réactif-clé est un réactif directement impliqué dans la reconnaissance des organismes recherchés.

Les laboratoires agréés évaluent les conséquences de la modification (d'une méthode par une autre ou d'un réactif-clé par un autre) conformément aux prescriptions du LNR et transmettent le dossier d'évaluation correspondant au LNR pour validation de cette modification.

Toute autre modification (qui n'a pas d'incidence prévisible sur le résultat) doit néanmoins faire l'objet d'une documentation apportant la preuve qu'elle n'interfère effectivement pas avec le résultat. Cette documentation est tenue en permanence à disposition du LNR.

Le ministère chargé de l'agriculture peut souhaiter faire profiter l'ensemble des laboratoires réalisant des analyses officielles des avantages que peuvent représenter les méthodes dérivées et alternatives qui lui sont proposées, en intégrant certaines modifications à l'occasion d'une révision de la méthode officielle. Le laboratoire à l'origine de l'amélioration est, dans ce cas, cité dans la méthode officielle.

Considérations d'ordre métrologique

Afin d'alléger la lecture des méthodes officielles, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte des méthodes).

Volume	**Volume < à 10 mL** : EMT = ± 10% **Volume ≥ à 10 mL** : EMT = ± 5 %
Masse	EMT = 10%
pH	EMT = 0,3 u
Température	**incubateur** : EMT = ± 3°C **réfrigérateur** : 5°C et EMT = ± 4°C **congélateur** : ≤ -18°C **congélateur froid intense** : ≤-65°C
Longueur	EMT = 10%
Temps	EMT = 10%

Obligations réglementaires et limites de responsabilité

La mise en œuvre des méthodes officielles s'applique sans préjudice des réglementations françaises et communautaires ou des exigences normatives auxquelles doivent se soumettre les laboratoires (circulation, détention, manipulation des organismes nuisibles, détention des substances réglementées, bonnes pratiques de laboratoire, santé et sécurité au travail, mesures de confinement, agrément des laboratoires, déclaration à la commission de génie génétique …).

Dans un certain nombre de cas, les méthodes peuvent appeler l'attention des lecteurs sur des risques potentiels liés par exemple à la dangerosité de certains produits ou à la rupture du confinement. Ces mises en garde ne sont destinées qu'à aider les lecteurs et n'ont vocation ni à être exhaustives, ni à se substituer aux exigences réglementaires existantes.

Toute personne physique ou morale constatant la présence, sur un végétal, une partie de végétal ou un produit d'origine végétale, d'un organisme nuisible réglementé a l'obligation d'en faire déclaration auprès des services régionaux de l'alimentation des directions régionales de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt.

Les conditions de mise en œuvre des méthodes officielles ainsi que la qualité des réactifs-clé utilisés sont susceptibles de modifier la qualité des résultats obtenus avec les méthodes officielles. Ces deux derniers aspects relèvent de la responsabilité des laboratoires utilisateurs.

Le ministère chargé de l'agriculture ne saurait être tenu pour responsable dans le cas de mises en œuvre inadéquates, volontaires ou non des méthodes officielles.

Revue des méthodes officielles, amendement et modification

Une consultation publique est organisée en tant que de besoin avant la publication des méthodes officielles. Le document de travail est mis à disposition sur le site du ministère en charge de l'agriculture pendant une période de deux mois, au cours de laquelle les visiteurs sont invités à faire connaître leurs remarques, commentaires et suggestion et à signaler toute erreur, omission ou imprécision.

Les méthodes officielles sont par ailleurs revues périodiquement à l'initiative du ministère chargé de l'agriculture ou du laboratoire national de référence. A chaque modification, le code de la méthode change comme indiqué au chapitre « principales modifications par rapport à la version précédente ».
Les usagers sont également invités à faire connaître dans les meilleurs délais leurs remarques, commentaires et suggestions, et à signaler toute erreur, omission ou imprécision constatées.

ORIGINE DE LA METHODE

La présente méthode a été élaborée par l’unité de bactériologie de la station d’Angers du Laboratoire National de la Protection des végétaux sur la base des anciennes méthodes spécifiques BV/06/01a et BH/06/01a, des directives 2006/63/CE et 2006/56/CE ainsi que de la fiche technique sur l’immunofluorescence de l’OEPP PM/7/97.

Le travail de relecture et de révision a été effectué par le pôle « Développement de méthodes et analyses » du LNPV.

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE

Une modification concerne des parties clé ou le fond même de la méthode officielle, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Sa prise en compte peut nécessiter des adaptations importantes, c'est pourquoi un délai est en règle générale accordé pour que les laboratoires de référence, agréés ou officiellement reconnus l'intègrent dans leur processus d'analyses. Dans certains cas, clairement précisés, une modification peut nécessiter une prise en compte immédiate par les laboratoires. En cas de modification majeure, le numéro de version est incrémenté d'une unité (exemple: le version v1c devient v2a). La méthode ainsi modifiée est considérée comme une nouvelle méthode.

Une amélioration est une modification mineure, qui apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. En cas d'amélioration, le numéro de version reste le même mais la lettre associée est incrémentée (exemple: la version v1c devient v1d). La méthode ainsi améliorée n'est pas considérée comme une nouvelle méthode.

Cette méthode officielle d'analyse est la première version concernant la technique d'immunofluorescence. Les modifications et améliorations listées ci-dessous sont celles apportées par rapport aux méthodes officielles sur la base desquelles elle a été établie (cf. origine de la méthode).

Modifications

Modification des modalités de qualification des lots d'*antisera* utilisés.
Correction de la formule de calcul de dénombrements de bactéries

Améliorations

- Mise en forme de la méthode et modification du préambule selon un schéma harmonisé commun à l'ensemble des nouvelles méthodes ;
- Apport de précisions et compléments sur le mode opératoire ;
- Retrait des définitions de ce document pour les intégrer dans un glossaire général ;
- Retrait des compositions de solutions pour les intégrer dans un répertoire général.

Nota bene: les améliorations de pure forme (y compris les corrections grammaticales ou orthographiques) ne sont pas reprises dans cette synthèse des modifications.

-

DESCRIPTION DE LA METHODE

1. Objet.

La présente méthode fixe les principes généraux de réalisation des analyses de dépistage ou d'identification des bactéries nuisibles pour les végétaux à l'aide de la technique d'immunofluorescence (IF) indirecte.
Les méthodes officielles spécifiques par matrice et organisme pathogène ou, à défaut, les fournisseurs de réactifs sérologiques, fixent les exigences spécifiques complémentaires à mettre en œuvre pour la réalisation pratique des analyses, notamment :

- la nature et la préparation de l'échantillon pour analyse,
- la nature et la réalisation de la prise d'analyse,
- l'extraction des antigènes (fragmentation, broyage, macération, ...),
- les modes de conservation du matériel végétal et de l'extrait.

Des consignes particulières peuvent également fixer les conditions ou éléments pouvant influer sur la qualité des résultats.

2. Domaine d'application.

Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

Toutes les analyses de dépistage ou d'identification des organismes pathogènes pour les végétaux faisant appel à la technique d'immunofluorescence indirecte sont concernées par la présente méthode.

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Les particularités des objets soumis à essais (nature, stade physiologique,…) et la taille des échantillons sont définies dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture ou dans les méthodes officielles. Les spécifications techniques relatives à l'analyse proprement dite sont précisées dans les méthodes officielles par matrice/hôte pathogène.

Grandeur de l'objet soumis à analyse.

Les délais *maxima* entre la réception de l'échantillon et le début effectif de l'analyse sont définis dans les méthodes officielles spécifiques voire dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

Précaution(s) particulière(s) à prendre.

La température et autres conditions de conservation des échantillons sont définies dans les méthodes officielles spécifiques voire dans les notes de services publiées par le ministère chargé de l'agriculture.

3. Présentation schématique de la détection

La présente méthode rappelle des exigences générales concernant les réactifs et les consommables, le matériel, les contrôles et témoins nécessaires pour la mise en œuvre d'une analyse par immunofluorescence (IF) indirecte. Elle présente ensuite les prescriptions techniques à respecter et appelle l'attention des utilisateurs sur les points clé de chaque étape constitutive de l'IF indirecte.

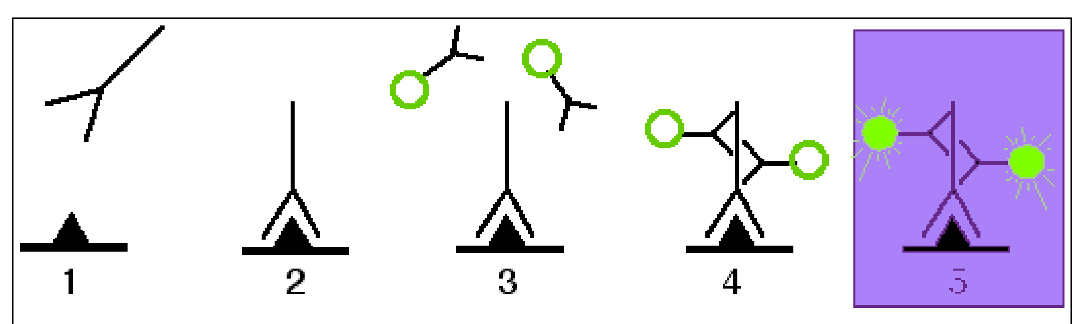
La technique décrite ci-après permet de révéler la présence de bactéries phytopathogènes dans des organes végétaux.

L'immunofluorescence est une technique sérologique basée sur la réaction antigène / anticorps, révélée grâce à un second anticorps spécifique du premier et couplé à un fluorochrome (schéma 1). Elle s'applique à toute bactérie pour laquelle il existe un *antiserum*. L'observation des extraits colorés se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence sous huile à immersion.

Cette méthode est qualitative. Cependant, un dénombrement de bactéries cibles peut être effectué sur la base d'un champ isolé de microscope ou d'un diamètre complet du puits (annexe II).
Le résultat de cette technique étant basé sur la reconnaissance visuelle des bactéries (morphologie, formes de division, localisation et intensité de la fluorescence), la compétence du personnel chargé des lectures est critique.

La technique d'immunofluorescence peut être réalisée :

- pour identifier une culture bactérienne pure ; elle se réalise alors sur suspensions bactériennes (environ 10^5 à 10^6 cellules/mL) ;
- pour détecter et identifier une bactérie au sein d'une matrice végétale ; elle se réalise alors à la suite d'un procédé d'extraction de la bactérie des tissus végétaux ;
- pour estimer la concentration bactérienne d'une suspension



- 1- fixation de l'extrait bactérien contenant l'antigène X sur lame. Ajout d'anticorps anti-X ; ces immunoglobulines sont produits en injectant l'antigène X à un animal Y (lapin en général).
- 2- les anticorps anti-X se fixent spécifiquement sur X.
- 3- ajout d'anticorps d'un animal Z anti-anticorps de Y, ces anticorps étant couplés à un marqueur fluorescent. Ces anticorps sont en général des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin fixés à une molécule de fluorescéine.
- 4- les anticorps de Z (chèvre) anti-Y se fixent spécifiquement sur les anticorps Y (lapin) anti-X.
- 5- observée sous lumière ultraviolette, la fluorescéine fixée émet une fluorescence en vert et permet de localiser la substance X.

Schéma 1 : Principe général de l'immunofluorescence (adapté de Philippe Denoulet, Roger Prat, université Pierre et Marie Curie; http ://www.snv.jussieu.fr/vie/)

L'intérêt principal de cette technique est qu'elle permet un diagnostic et une identification rapides dans le cas de bactéries difficilement isolables sur milieux de culture ; elle est parfois utilisée en dépistage rapide ; par contre, le résultat ne donne pas, en principe, d'indication en terme de viabilité du pathogène détecté et la technique ne permet pas d'isoler la bactérie mise en évidence.

De manière générale, les anticorps étant dirigés spécifiquement contre une bactérie donnée, les *antisera* permettent habituellement d'obtenir une bonne sensibilité de détection des bactéries. L'immunofluorescence peut donc être utilisée en dépistage, *i.e*. de séparer les échantillons potentiellement non contaminés de ceux qui sont susceptibles d'être contaminés par la bactérie recherchée. Cependant, il peut exister d'autres bactéries pathogènes et / ou saprophytes présentes sur le végétal analysé avec lesquelles l'*antiserum* réagit. Cette réaction est communément appelée « réaction croisée». La confirmation des résultats doit être effectuée conformément au schéma de détection décrit dans la méthode spécifique.

4. Produits et consommables

En règle générale, le manipulateur doit veiller à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant interférer sur le résultat par l'utilisation de produits et consommables appropriés.
Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut, le laboratoire définira les conditions qu'il jugera les plus optimales.

4.1. Les *antisera (anticorps anti-cible et anticorps conjugués-FITC)*

4.1.1. Choix du fournisseur par le laboratoire utilisateur

Les *antisera* sont des réactifs -clé des analyses par immunofluorescence.
Lorsque l'information est disponible, le laboratoire doit choisir le fournisseur en fonction :

- des critères de performance des réactifs eux-mêmes ou de la capacité des réactifs à atteindre les critères de performance de la méthode officielle lorsqu'ils sont précisés (ex : sensibilité, spécificité et titre minimum). Le laboratoire national de référence peut préconiser ou déconseiller l'usage de certains *antisera* après évaluation ;
- de la capacité du fournisseur à donner des informations concernant l'identification, le stockage, le mode d'emploi (ex : dilution d'emploi) et les contrôles qualité internes de ses réactifs.

Lorsque l'information n'est pas disponible, le laboratoire utilisateur veillera à qualifier ses réactifs (cf. annexe I).
Les réactifs sérologiques doivent être utilisés en respectant les préconisations du fabricant en ce qui concerne les conditions d'utilisation. Des recommandations sur le titre ou la dilution d'emploi peuvent êtres définies par le laboratoire de référence ou le fournisseur.

4.1.2. Contrôles effectués par le laboratoire utilisateur

Le laboratoire utilisateur doit procéder au contrôle de la qualité des *antisera* en tant que réactif clé lorsqu'il utilise :

a) une nouvelle source d'*antiserum* (*antiserum* de fournisseur différent) ou un *antiserum* différent de celui préconisé dans la méthode officielle (ou une annexe de la méthode officielle) ;
b) un nouveau lot de fabrication d'*antiserum*,
c) en cours d'utilisation, à intervalles prédéfinis ou autant que de besoin, en ce qui concerne la dilution d'emploi

Ces contrôles seront réalisés préalablement à la mise en œuvre des analyses conformément aux dispositions de l'annexe I.

4.2. Éthanol à 95°GL (non dénaturé)

Il sert à fixer l'extrait bactérien ou végétal sur lame, préalablement au test d'immunofluorescence. Ce produit étant inflammable, il doit être tenu éloigné des sources de chaleur et des flammes nues.

4.3. Tampon de rinçage et de dilution d'*antisera*

Suivre les prescriptions des méthodes d'analyses spécifiques. En l'absence de précisions, utiliser du PBS 0,01 M, pH = 7,2 dont la composition et la préparation sont données dans le répertoire des recettes REP 001.

4.4. Solution de bleu Evans

Le réactif conjugué avec l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) peut être utilisé avec un contre-marqueur type bleu d'Evans. Ce produit colore en rouge les fragments de végétaux augmentant le contraste (composition : répertoire des recettes REP 001).

4.5. Solution de glycérine tamponnée au phosphate

La solution de glycérine tamponnée peut être remplacée par un liquide de montage, type résine adapté à l'immunofluorescence (composition: répertoire des recettes REP 001).

4.6. Huile à immersion

Elle devra être adaptée au type et à la marque de microscope utilisé.

5. Appareillage et matériel

Pour la mise en œuvre d'analyses d'immunofluorescence indirecte, les matériels et appareillages nécessaires à la réalisation de la méthode sont des appareillages courant de laboratoire de microbiologie et notamment la liste ci-dessous. La lecture des lames au microscope s'effectue à l'obscurité.

5.1. Gros matériel :

- microscope équipé pour les observations en épifluorescence ;
- autoclave (pour la fabrication des tampons et milieux) ;
- incubateur bactériologique (pour l'incubation des souches bactériennes témoins) ;
- réfrigérateur ;
- congélateur ;
- balance d'exactitude adaptée ;
- incubateur de lames (facultatif).

5.2. Petit matériel :

- verrerie de laboratoire et/ou matériel à usage unique (éprouvettes, tubes, flacons) ;
- pipettes automatiques et cônes stériles correspondants ;
- lames multi-puits (de diamètre 8 mm de préférence) et lamelles couvre-objets ;
- bec type bunsen ou hotte à flux laminaire ;
- pHmètre.

6. Contrôles et témoins (références de lecture)

Pour chaque série d'analyses, préparer une lame témoin positif et une lame témoin négatif destinées à vérifier que la manipulation est conforme.

La préparation des lames témoins peut être réalisée à l'avance. La coloration des lames échantillons et celle des lames témoins sera quant à elle réalisée en même temps, avec les mêmes réactifs et dans les mêmes conditions.

6.1. Lames témoin positif

La procédure de préparation des lames témoin positif est la suivante :
Une souche de référence est étalée stérilement sur une boîte de Petri contenant du milieu de culture favorable à la croissance de la bactérie et en incubation à une température adaptée, pendant le temps nécessaire à la croissance des colonies. Après incubation, la culture bactérienne est prélevée et mise en suspension dans de l'extrait de végétal sain. Préparer ensuite une gamme de dilution (au 1/10, 1/100 et au 1/1000) afin d'obtenir une gamme d'approximativement 10^7 à 10^4 cellules/mL et la déposer directement dans les puits, puis fixer selon les conditions du point 7.2.

Une série de lames témoins peut être préparée à l'avance et conservée dans des conditions permettant d'assurer la validation de la coloration par immunofluorescence (réfrigérateur ou congélateur). Quand cela est possible, il peut également être préparé des témoins positifs à partir d'extraits contaminés. Avant toute utilisation en routine, le test d'immunofluorescence est appliqué à l'une des lames témoins de la série préparée, afin de vérifier que le résultat obtenu est conforme aux attentes.

Des procédés de préparation de témoin positif peuvent être spécifiques à certaines méthodes / couples hôtes-pathogènes (dilutions de suspension bactérienne sans dilution d'extrait ; concentration par centrifugation et dilutions, etc. …). Dans ce cas, ils se substituent à ceux décrits ici.



Afin d'éviter toutes contaminations, il est impératif de préparer séparément les échantillons à analyser et les témoins positifs ; ceci implique, notamment, des lieux de stockage et de préparation séparés.

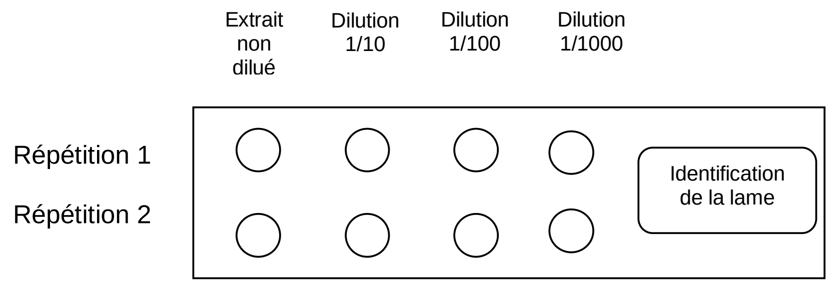


Schéma 2 : Exemple de plan de lame témoin positif

6.2. Lames témoin négatif

La lame validant l'absence de contamination de la solution de macération peut être réalisée, soit à partir du tampon de macération, soit avec un échantillon végétal de statut confirmé négatif. Dans ce cas, l'échantillon négatif « de référence » est extrait avec les échantillons à tester.

7. Etapes de l'analyse

7.1. Extraction à partir des échantillons

Se référer aux méthodes officielles spécifiques.

7.2. Dépôt et fixation des échantillons

7.2.1. Dépôt des échantillons sur lames

Chaque lame, clairement identifiée, doit comporter un seul échantillon afin d'éviter tout risque d'inter-contaminations.

Il doit être déposé successivement à la pipette, dans chaque puits, un volume approprié d'extrait végétal en fonction du diamètre des spots (par exemple, un volume de 40µL est préconisé dans des puits de diamètre 8 mm). Le volume à déposer est précisé dans les méthodes spécifiques ; de même, des dilutions d'échantillon peuvent être exigées et seront déposées sur la même lame (schéma 3a). Dans le cas d'analyse avec des sous-échantillons (semences par exemple), ceux correspondant à un même échantillon sont déposés sur la même lame (schéma 3b).
NB : Il peut être réalisé une répétition de chaque dépôt.

Schéma 3a : Exemple de plan de lame pour analyse d'un échantillon avec dilutions

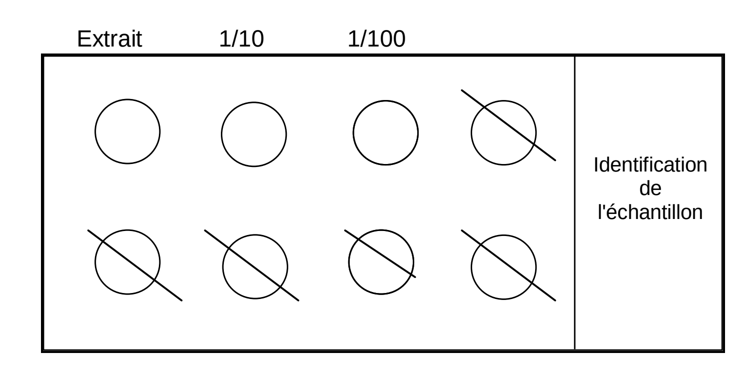
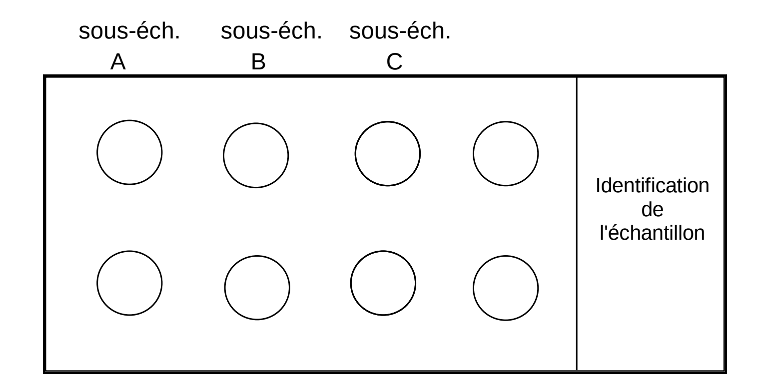


Schéma 3b : Exemple de plans de lame pour analyse avec sous-échantillons



7.2.2. Fixation des extraits

Après dépôt des extraits, les lames sont laissées à sécher soit à l'air libre, soit à l'aide d'un équipement adapté (incubateur à lames ou enceinte ventilée).
Après séchage, les dépôts sont fixés en les couvrant d'éthanol à 95°GL en les laissant sécher soit à l 'air libre, soit à l'aide d'un équipement adapté (par exemple, incubateur à lames).



Il est possible d'interrompre l'analyse à ce niveau pendant quelques jours, il convient alors de stocker les lames dans des conditions adaptées (à 4°C par exemp le).

7.3. Coloration par immunofluorescence indirecte

7.3.1. Dépôt des anticorps anti-cible

Les puits sont couverts de la solution d'*antiserum* diluée dans le tampon à la dilution d'emploi (annexe I) à raison d'un volume égal au volume de l'extrait à analyser déposé. Puis, ils sont laissés à incuber, à température ambiante, pendant environ 30 minutes (sauf préconisations contraires du fournisseur), en prenant les mesures nécessaires pour que la solution déposée ne sèche pas (application d'un couvercle ; papier humidifié,…).

7.3.2. Première série de rinçages

L'excès d'*antiserum* est éliminé en rinçant soigneusement les lames avec le tampon PBS 0,01 M, pH = 7,2 (ou équivalent). Les rinçages sont réalisés par lavages rapides ou par incubation dans le PBS.
A la fin du dernier rinçage, le tampon excédentaire est éliminé avec soin en secouant la lame et / ou en absorbant l'excès de liquide délicatement à la surface des lames à l'aide d'un papier absorbant.
Certaines méthodes peuvent préconiser l'utilisation de PBS-tween.

7.3.3. Dépôt des anticorps conjugués

Les puits sont couverts, avec un volume égal au volume de l'extrait à analyser, de la solution d'anticorps conjugués au FITC dilué dans le tampon PBS 0,01 M, pH = 7,2 (ou équivalent). Il peut être ajouté du Bleu Evans en solution mère à 1% dans la préparation du conjugué, à une dilution de 1/300ème. Puis, ils sont laissés à incuber, à température ambiante et à l'obscurité, pendant environ 30 minutes (sauf préconisations contraires du fournisseur), en prenant les mesures nécessaires pour que la solution déposée ne sèche pas (application d'un couvercle ; papier humidifié,…).

7.3.4. Deuxième série de rinçages

Rincer et laver comme précédemment (7.3.2).

7.3.5. Montage des lames colorées

Les préparations sont recouvertes de glycérine tamponnée ou tout autre liquide de montage adapté (liquide de type résine), puis d'une lamelle.

Les lames sont conservées jusqu'à la lecture à l'abri de la lumière et au frais. Cependant, les lames montées doivent être observées au microscope à épifluorescence dans les meilleurs délais. Celles fixées avec une résine ne sont lisibles qu'après polymérisation réalisée en conditions spécifiées (respecter les prescriptions du fabricant).

En cas d'utilisation de la glycérine tamponnée, une conservation de longue durée est possible après lutage de la lame et de la lamelle avec une résine type vernis à ongles.

8. Résultats

8.1. Validation des résultats

Les lames sont observées au microscope à épifluorescence en utilisant un filtre adapté au FITC, sous immersion, à un grossissement compris entre x 500 et x 1000.

8.1.1. Lame témoin positif

La lame témoin positif doit être observée en premier. Des bactéries de morphologie et de taille typiques des cellules recherchées, bien marquées par le fluorochrome, doivent être observées.

Si les extraits présentent une réaction anormale ou de mauvaise qualité, il faut considérer que la coloration n'est pas correcte et recommencer la série d'analyses à partir du point 7.2.

Si la coloration est de bonne qualité, il doit être procédé à la lecture de la lame témoin négatif.

8.1.2. Lame témoin négatif

Dans les extraits correspondant au(x) témoin(s) négatif(s), aucune bactérie caractéristique ne doit être marquée par la fluorescéine.

Lorsque les témoins sont conformes, la lecture des lames-échantillons peut être réalisée.

8.2. Lames-échantillons

Pour chaque puits, il faut observer successivement et au minimum :
- un diamètre de spot complet,
- ¼ du pourtour du puits.

En cas de suspicion de positivité ou de doute, l'observation sera étendue à :
- plusieurs diamètres,
- un pourtour complet du puits.

Les bactéries fluorescentes présentant une morphologie typique (taille et forme) sont recherchées; les contours de la bactérie doivent être visibles et avoir une forme équivalente à celles du témoin positif. Cependant, une lame témoin positif réalisée avec une souche en croissance sur milieu nutritif peut avoir des bactéries de taille supérieure à celles présente dans un extrait végétal. De plus, en présence d'une forte concentration de bactéries-cibles, la fluorescence peut être diluée et donc moins intense. Dans ce cas, il est conseillé de recommencer l'immunofluorescence après dilution de l'extrait afin de mieux visualiser les cellules.

Les critères de reconnaissance des bactéries cibles sont :
- la forme de la bactérie, en particulier les formes de division si elles sont présentes ;
- la taille de la bactérie ;
- la qualité de la coloration de la bactérie : fluorescence intense et continue de la paroi bactérienne.

Si l'échantillon contient des bactéries ayant une morphologie caractéristique et une fluorescence conforme, celles-ci peuvent être dénombrées sur un minimum de 10 champs microscopiques ou sur un diamètre du puits, de manière à évaluer leur concentration (N) par millilitre d'extrait concentré non dilué (annexe II) .

NB : La lecture peut s'avérer délicate étant donné les limites inhérentes aux tests d'immunofluorescence :
- des bactéries autres que la bactérie-cible (ex : morphologiquement atypiques) peuvent être fluorescentes et donc gêner la lecture ;
- le seuil technique de détection de l'immunofluorescence est de l'ordre de 10^3 à 10^4 cellules par millilitre d'extrait, en fonction du nombre de champs ou diamètres observés (cf annexe II).

8.3. Interprétation et formulation des résultats

8.3.1. Statut des échantillons

Le **<u>test d'immunofluorescence est « négatif »</u>** pour tous les échantillons dans lesquels aucune bactérie à fluorescence vive et morphologiquement typique n'a été trouvée.

Le **<u>test d'immunofluorescence est « positif »</u>** pour tous les échantillons dans lesquels ont été observées des bactéries caractéristiques.

En fonction des couples bactérie/matrice, il peut être recommandé d'analyser avec un second *antiserum* anti-cible (d'un autre fournisseur par exemple) si disponible et préalablement qualifié, les échantillons pour lesquels le résultat d'un premier test IF est positif ou suspect.

8.3.2. Dénombrement de bactéries

Il est possible avec la technique IF de procéder à une estimation de la charge bactérienne des extraits analysés. Pour cela, se référer à l'annexe II.
Pour certains couples bactérie/matrice, le dénombrement peut être exigé en cas de positif. Se reporter aux méthodes spécifiques.

8.4. Confirmation de la présence de la bactérie détectée

En raison des risques de faux-positifs avec la technique IF indirecte, une confirmation par une technique autre (isolement sur milieux, test biologique, PCR,…) est recommandée pour certains couples matrice/pathogène. Cette confirmation est effectuée au sein du même laboratoire ou dans un laboratoire de référence conformément aux schémas de détection et aux méthodes spécifiques officiels.

9. Élimination des matériels susceptibles d'être contaminants

Le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte les risques liés aux matériels susceptibles d'être contaminant pour garantir l'absence de dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

10. Conservation des reliquats de matériels utilisés

Sauf mention contraire explicite ou impossibilité technique avérée, les laboratoires doivent conserver les reliquats pertinents (nature, quantité et qualité) de matériel soumis à analyse, dans des conditions appropriées garantissant leur intégrité, jusqu'à au moins le dixième jour ouvrable suivant l'envoi au demandeur d'un rapport d'analyse concluant à la non mise en évidence de l'organisme recherché. Ce délai imposé est destiné à laisser le temps au demandeur de l'analyse de contester le résultat auprès du laboratoire (ce qui prolonge la conservation du reliquat jusqu'à l'issue de la contestation) et éventuellement de demander une analyse contradictoire.

Dans le cas de mise en évidence de l'organisme recherché, et sauf indications plus précises dans la méthode, l'ensemble des reliquats pertinents doit être conservé pendant une durée minimale de 12 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats. Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

LISTE DES DOCUMENTS OFFICIELS APPELES PAR LA METHODE

Référence	Titre
GLO 001	Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV
REP 001	Répertoire des recettes en vigueur au LNPV

REMERCIEMENTS

Le LNPV remercie pour leur relecture et leurs commentaires les laboratoires suivants : LDA 22, LDA 59, GEVES-SNES.

BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

Directive 2006/63/CE de la Commission du 14 juillet 2006 modifiant les annexes II à VII de la directive 98/57/CE du Conseil concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Directive 2006/56/CE de la Commission du 12 juin 206 modifiant les annexes de la directive 93/85/CEE du Conseil concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre

Letonturier, P (1996) Abrégé d'Immunologie générale, Masson, Paris

OEPP/EPPO (2010) EPPO standards PM 7/97 Immunofluorescence test, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39, 413–416

Rat, B. (1984) Technique de détection de *Corynebacterium michiganense* dans les semences de tomate. In *Report on the First International Workshop on Seed Bacteriology,* pp. 35-37. ISTA, Zurich (CH).

ANNEXE I. QUALIFICATION DES REACTIFS SEROLOGIQUES POUR IF

Les *antisera* sont des réactifs clé dans les analyses d'immunofluorescence. Ils doivent faire l'objet de vérifications / contrôles avant et pendant leur emploi :

1) lors de changement de lot d'*antiserum* : vérification dans la continuité que le nouveau lot est aussi performant que le précédent ;détermination de la dilution d'emploi ;
2) en cours d'emploi : vérification régulière de la dilution d'emploi ;
3) lors de changement d'*antiserum* : vérification que les critères de performance de la méthode ne sont pas altérés.

I. Détermination ou vérification de la dilution d'emploi

1.1. Définition de la dilution d'emploi :

La dilution d'emploi est définie comme la plus grande dilution (plus faible concentration donc) du réactif donnant une réaction positive intense optimale avec une suspension bactérienne contenant une quantité connue d'antigènes (en général 10^5 à 10^6 cellules/mL) d'une souche homologue à celle recherchée et, en utilisant le conjugué FITC à une dilution donnée.

Les *antisera* sont en général commercialisés avec une dilution d'emploi recommandée (souvent appelée titre). Cependant, la dilution optimale d'emploi peut varier en fonction des conditions locales d'utilisation du réactif. Il est donc recommandé de **vérifier la dilution d'emploi de chaque *antiserum* avant emploi**. En raison de l'évolution possible de cette dilution d'emploi dans le temps, le laboratoire doit définir une procédure de vérification régulière des *antisera* reconnaissant l'antigène, du conjugué et fixer une période de validité (maximum 1 an).

1.2. Détermination de la dilution d'emploi d'un réactif par immunofluorescence:

Sur une lame multi-puits pour IF,

- déposer la gamme d'une suspension bactérienne donnée (10^5 à $10^{6)}$ et la fixer ;
- réaliser une série de dilutions de l'*antiserum* et du conjugué à qualifier (tableau 1) ; les déterminations des dilutions d'emploi de l'*antiserum* et du conjugué peuvent être réalisées séparément ;
- réaliser la coloration par immunofluorescence aux différentes concentrations ;
- observer chaque puits coloré sous microscope à épifluorescence et noter l'intensité de la fluorescence par des signes ''+ ''.

NB : Dans ces conditions, il est possible de mettre en évidence, sans confusion, des populations de bactéries inférieures ou égales à 10^6 cellules/mL. Pour des quantités de bactéries supérieures, des différences dans l'homogénéité de la fluorescence sont observées : l'intensité de la fluorescence générale de la préparation est faible avec localement des cellules bien marquées, aux endroits où la population bactérienne est moins dense.

Tableau 1 : exemple de dilutions des réactifs (anticorps et conjugué FITC) en immunofluorescence

Dilution de l'*antiserum*	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Dilution du conjugué							
1/50	+++	+++	+++	++	+	-	-
1/100	+++	+++	+++	++	+	-	-
1/200	+++	+++	+++	++	+	-	-
1/400	+	+	+	-	-	-	-
1/800	-	-	-	-	-	-	-

"-" = aucune fluorescence

Le nombre de "+" indique l'intensité de la fluorescence Dans l'exemple ci-dessus, la dilution d'emploi recommandée de l'*antiserum* sera de 1/400 et celui du conjugué de 1/200.

Remarque : Pour certains agents pathogènes, des exigences de dilution d'emploi sont précisées dans les méthodes officielles.

II. Validation dans la continuité

* Lorsqu'il s'agit uniquement de vérifier la qualité d'un nouveau lot de fabrication d'un *antiserum* (même fournisseur) utilisé **pour des analyses de dépistage** en tant qu'utilisateur, le contrôle se fera sur :

- 3 échantillons de routine (pris au hasard, de statut inconnu) ou
- sur 3 échantillons de statut connu (2 positifs et un négatif)

testés en parallèle avec le nouveau et l'ancien lot d'*antiserum* ; les *antisera* étant utilisés à leur dilution d'emploi (déterminée au préalable).

et

- sur une gamme de dilution (5 dilutions) préparée à partir d'un échantillon de statut positif connu ou
- sur une gamme de dilution d'une souche remise en suspension dans du tampon de macération ou
- sur une gamme de dilution d'une souche diluée dans de l'extrait végétal,

Ces tests visent à vérifier l'absence de différence entre les lots sur le contrôle du bruit de fond (absence d'interaction entre l'*antiserum* et la matrice) et le seuil de détection obtenu par le nouveau lot d'*antiserum*.

* Lorsqu'il s'agit de vérifier la qualité d'un nouveau lot de fabrication d'un *antiserum* (même fournisseur) utilisé **pour des analyses d'identification** en tant qu'utilisateur, le contrôle se fera *a minima* sur :

- 5 souches cibles et
- 5 souches non cibles, certaines étant proches génétiquement, d'autres étant des bactéries isolées des mêmes matrices.

Ces tests visent à vérifier l'inclusivité et la spécificité de l'*antiserum*.

Le nouveau lot d'*antiserum* est validé, par le laboratoire utilisateur, lorsque tous les résultats obtenus entre le nouveau lot d'*antiserum* et le précédent sont concordants. Pour les tests effectués pour les analyses de dépistage, le seuil de détection minimum devrait se situer entre 10^3 et 10^4 ufc /mL.

III. Validation d'un nouvel antiserum

En principe, les *antisera* sont dirigés spécifiquement contre une bactérie donnée. Cependant, il peut exister d'autres bactéries présentes sur le végétal analysé avec lesquelles l'*antiserum* réagit. Il convient donc de vérifier la capacité des *antisera* à détecter différentes souches d'une même bactérie-cible (inclusivité) et à ne pas détecter les différents pathovars, sous- espèces ou autres (spécificité).

Pour vérifier (en tant que laboratoire-utilisateur) la qualité d'un *antiserum* nouveau ou différent de celui préconisé dans la méthode officielle, 2 méthodes sont possibles :

i) réaliser les analyses en utilisant des témoins de référence positifs et négatifs, si possible avec du matériel végétal contaminé et sain, traités selon les prescriptions de la méthode officielle ; dans ce cas, il convient de réaliser *a minima* l'évaluation sur :
- 7 échantillons[1] contenant la cible (échantillons naturellement ou artificiellement contaminés ou souches en suspension,…) ;
- 7 échantillons[1] ne contenant pas la cible dont 3 échantillons sains (matrice végétale non contaminée par la cible) et 4 échantillons contaminés avec des organismes non cibles ou des organismes non cibles mis en suspension (organismes proches génétiquement ou issus de la flore saprophyte de la même matrice) ;
- 2 gammes de dilutions (5 dilutions par gamme) de souches cibles en suspension afin d'évaluer le seuil de détection, les deux *antisera* étant utilisés à leur dilution d'emploi (déterminée au préalable).

[1] La liste des souches à tester peut être déterminée par le laboratoire national de référence

ii) réaliser des analyses en comparant les résultats obtenus avec le nouvel *antiserum* et celui préconisé ou celui utilisé précédemment, en suivant les préconisations de la méthode officielle spécifique hôte/pathogène ou tout autre document officiel. Dans ce cas, le contrôle se fera, sauf impossibilité liée au volume d'analyses, *a minima* sur 10 échantillons de routine ou de statut connu (testés en double) et deux gammes de dilution de souches de référence.

Ces données sont soumises à validation par le laboratoire national de référence pour les nouveaux *antisera* ou ceux différents de ceux préconisés par la méthode officielle. L'*antiserum* est validé par le LNR lorsque les critères de performance (sensibilité, spécificité, seuils de détection, dilution d'emploi…) attendus sont atteints.

Tout résultat discordant pourra, le cas échéant, donner lieu à une confirmation par le LNR afin de déterminer si la discordance observée est erronée ou non.

ANNEXE II – DENOMBREMENT DE BACTERIES

1. COMPTAGE SUR UN DIAMETRE COMPLET

1.1. Formule générale

$$N = \frac{n \times \pi \times D \times G \times K}{4 \times i \times V}$$

Avec N : nombre de cellules fluorescentes typiques par millilitre d'extrait concentré
D : diamètre du spot (mm)
V : volume de la goutte déposé sur le spot (mL)
n : nombre de cellules recensées sur un diamètre
Et relatifs au microscope utilisé :
i : coefficient du champ (dépend du type d'oculaire et varie de 8 à 24)
K : coefficient du tube (1 ou 1,25)
G : grossissement de l'objectif (40 à 100)

1.2. Formules calculées (tableau 2)

Sur la base de cet exemple, le seuil technique de détection est donc de 630 bactéries par mL, basé sur la visualisation d'une bactérie sur un diamètre pour un microscope donné (i=25 et K=1).

2. COMPTAGE SUR CHAMPS ISOLES (APPENDICE 4 DE L'ARRETE DU 6 DECEMBRE 1994 - J.O. DU 5 FEVRIER 1995)

$$N = \frac{c\, D^2\, G^2\, K^2}{i^2\, V} \times F$$

où c = nombre de cellules fluorescentes typiques comptées par champ
F = facteur de dilution de l'extrait concentré

- **Tableau 2:**

Exemple de comptage sur un diamètre complet
Les valeurs ci dessus sont données pour i=25, G=100, K=1, D=8 mm, V=0.04 mL.

n	N	n	N
1	$6,3.10^2$	**26**	$1,6.10^4$
2	$1,3.10^3$	**27**	$1,7.10^4$
3	$1,9.10^3$	**28**	$1,8.10^4$
4	$2,5.10^3$	**29**	$1,8.10^4$
5	$3,1.10^3$	**30**	$1,9.10^4$
6	$3,8.10^3$	**31**	$1,9.10^4$
7	$4,4.10^3$	**32**	$2,0.10^4$
8	$5,0.10^3$	**33**	$2,0.10^4$
9	$5,6.10^3$	**34**	$2,1.10^4$
10	$6,3.10^3$	**35**	$2,2.10^4$
11	$6,9.10^3$	**36**	$2,3.10^4$
12	$7,5.10^3$	**37**	$2,3.10^4$
13	$8,2.10^3$	**38**	$2,4.10^4$
14	$8,8.10^3$	**39**	$2,4.10^4$
15	$9,4.10^3$	**40**	$2,5.10^4$
16	$1,0.10^4$	**41**	$2,6.10^4$
17	$1,1.10^4$	**42**	$2,6.10^4$
18	$1,1.10^4$	**43**	$2,7.10^4$
19	$1,2.10^4$	**44**	$2,8.10^4$
20	$1,3.10^4$	**45**	$2,8.10^4$
21	$1,3.10^4$	**46**	$2,9.10^4$
22	$1,4.10^4$	**47**	$2,9.10^4$
23	$1,4.10^4$	**48**	$3,0.10^4$
24	$1,5.10^4$	**49**	$3,1.10^4$
25	$1,6.10^4$	**50**	$3,1.10^4$

Pour toute demande à caractère scientifique et technique relative à ce document, le point de contact national désigné par le ministère chargé de l'agriculture est le laboratoire national de référence concerné :

Laboratoire national de la protection des végétaux,
7 rue Jean Dixméras, 49044 ANGERS cedex 01
lnpv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Ce document est édité par :

Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche
Direction générale de l'alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de la production primaire
Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux
251 rue de Vaugirard, 75732 PARIS Cedex 15
www.agriculture.gouv.fr

auprès de qui toute autre correspondance peut être adressée.